








## Method for the quantitative detection of vital epithelial tumour cells in a body fluid

**Patent number:** EP1262776  
**Publication date:** 2002-12-04  
**Inventor:** PACHMANN ULRICH (DE); PACHMANN KATHARINA (DE)  
**Applicant:** PACHMANN ULRICH (DE); PACHMANN KATHARINA (DE)  
**Classification:**  
- **International:**  
- **European:** G01N33/574V2; G01N33/574V4  
**Application number:** EP20020011919 20020529  
**Priority number(s):** DE20011027079 20010602

**Also published as:**

 US2003017514 (A1)  
 EP1262776 (A3)  
 DE10127079 (A1)

**Cited documents:**

 WO9941613  
 XP009017863  
 XP009017864  
 XP002258639

**Report a data error here**

**Abstract of EP1262776**

Quantitative determination (M1) of live epithelial tumor cells (A) in a body fluid by laser-scanning cytometry, is new. (M1) comprises labeling (A) in a predetermined amount of body fluid by adding: (i) anti-human epithelial antibody (Ab) coupled to magnetic beads; and (ii) same antibody coupled to a fluorophore. (A) are then concentrated magnetically, the resulting suspension immobilized on a carrier by spontaneous adhesion and (A) determined by laser-scanning cytometry. The number of (A) relative to the amount of body fluid sample is calculated.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**04.12.2002 Patentblatt 2002/49**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/543, G01N 33/574**

(21) Anmeldenummer: **02011919.4**

(22) Anmeldetag: **29.05.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(72) Erfinder:  
• **Pachmann, Ulrich**  
**95448 Bayreuth (DE)**  
• **Pachmann, Katharina**  
**95448 Bayreuth (DE)**

(30) Priorität: **02.06.2001 DE 10127079**

(74) Vertreter: **Gassner, Wolfgang, Dr.**  
**Patentanwalt**  
**Nägelsbachstrasse 49a**  
**91052 Erlangen (DE)**

(71) Anmelder:  
• **Pachmann, Ulrich**  
**95448 Bayreuth (DE)**  
• **Pachmann, Katharina**  
**95448 Bayreuth (DE)**

(54) **Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit mit folgenden Schritten:

- a) Bereitstellen einer bestimmten Menge einer Körperflüssigkeit,
- b) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an magnetische Partikel gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,
- c) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,
- d) Magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen,

e) Immobilisierung der so erhaltenen Suspension auf einem Trägermaterial durch selbständiges Anhaften der vitalen Tumorzellen,

f) Erfassung der vitalen epithelialen Tumorzellen mittels Laser-Scanning-Cytometrie und Berechnung der Anzahl dieser Zellen in bezug auf die Menge der bereitgestellten Körperflüssigkeit.

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler, epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit.

**[0002]** Die Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Indikation solider Tumoren. Bekanntlich ist die Metastasierung bei soliden Tumoren der Hauptgrund für hohe Krebssterblichkeit. Sie wird durch Zellen verursacht, die in den Lymphknoten disseminiert werden und/oder im peripheren Blut zirkulieren. Von den zirkulierenden Tumorzellen kann unter Umständen ein Teil in entfernte Kompartimente gelangen, wo sie erneut zu wachsen beginnen. Derartige Kompartimente sind bei einigen Tumoren bekannt. Bei Brustkrebs und Dickdarmkrebs ist ein solches Kompartiment das Knochenmark. Die Häufigkeit der Tumorzellen in Bezug auf normale Knochenmarkszellen beträgt höchstens  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  Tumorzellen/normale Knochenmarkszellen. Um Proben für eine Knochenmarksdiagnostik zu erhalten, ist ein spezieller Eingriff in Verbindung mit oder nach einer Operation erforderlich. Eine regelmäßige Kontrolle würde eine Wiederholung eines derartigen Eingriffs erfordern. Wegen der damit verbundenen Unannehmlichkeiten für den Patienten sowie des Kosten- und Zeitaufwands ist man bestrebt, die Anzahl operativer Eingriffe möglichst gering zu halten.

**[0003]** Eine weitere Möglichkeit bietet eine Untersuchung des wesentlich leichter zugänglichen peripheren Blutes. Dabei tritt allerdings das Problem auf, daß darin nachweisbare Tumorzellen nur in äußerst geringer Anzahl vorhanden sind. Erschwerend kommt hinzu, daß die im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen das Transplantat bei einer Hochdosis-Chemotherapie oder einer autologen peripheren Blutstammzellentransplantation kontaminieren können. Es sind deshalb hochempfindliche Systeme notwendig, um eine derart geringe Anzahl an restlichen Tumorzellen nachzuweisen.

**[0004]** Das derzeit empfindlichste Nachweisverfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Bei hämatologischen Malignomen zeigt die PCR von Gensequenzen, die mit dem Tumor assoziiert sind, eine hohe Empfindlichkeit beim Nachweis einer geringen Zahl an Tumorzellen. Allerdings ist bei soliden Tumoren die PCR mit Problemen hinsichtlich der Anwendbarkeit, der Spezifität und des klinischen Einflusses verbunden. Als weiteres Verfahren kann auch die gewebe- und reifungsabhängige Expression der Oberflächen- oder intrazellulären Antigene genutzt werden, um aberrante Zellen vom normalem Gewebe immunologisch zu unterscheiden. Die Häufigkeit von  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$ , mit der Tumorzellen aus soliden Tumoren normalerweise in peripherem Blut zu erwarten sind, erfordert aber die Prüfung einer hohen Anzahl negativer Zellen, um eine positive Zelle bzw. eine Tumorzelle zu finden. Ein derartiger immunologischer Nachweis der Tumorzellen muß mit Hilfe eines Mikroskops vorgenommen werden. Er ist mit einem sehr hohen Aufwand verbunden. Dabei kön-

nen Tumorzellen aufgrund ihrer geringen Anzahl übersehen werden. Die Genauigkeit eines solchen Nachweisverfahrens vergleichsweise gering ist. Auch die Verwendung von Bildanalyseverfahren verbessert die Sensitivität und die Geschwindigkeit nur unwesentlich.

**[0005]** Bei bekannten Verfahren wird die Anzahl der Tumorzellen in Bezug auf die Anzahl aller Zellen, beispielsweise der Leukozyten, ermittelt. Die Anzahl der Leukozyten kann aber zum Beispiel bei einer Hochdosis-Chemotherapie stark schwanken, so daß die Anzahl der Tumorzellen in Bezug auf die Anzahl von Leukozyten nur bedingt aussagefähig ist.

**[0006]** Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein verbessertes Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit angegeben werden, dessen Genauigkeit und Geschwindigkeit die bisher bekannter Verfahren übertrifft.

**[0007]** Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11.

**[0008]** Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Bereitstellen einer bestimmten Menge einer Körperflüssigkeit,

b) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an magnetische Partikel gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,

c) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,

d) Magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen,

e) Immobilisieren der so erhaltenen Suspension auf einem Trägermaterial durch selbständiges Anhaften der vitalen Tumorzellen,

f) Erfassen der vitalen epithelialen Tumorzellen mittels Laser-Scanning-Cytometrie und Berechnen der Anzahl dieser Zellen in Bezug auf die Menge der bereitgestellten Körperflüssigkeit.

**[0009]** Das vorgeschlagene Verfahren bietet die Möglichkeit, die Anzahl von vitalen epithelialen Tumorzellen direkt in einer Körperflüssigkeit, wie beispielsweise Blut, Knochenmark, Knochenmark-Aspirat, Transsudat, Exsudat, Lymphe, Apheresat, Aszites, Urin, Speichel und

Drainageflüssigkeiten aus Wundsekreten, zu bestimmen. Die eingesetzten Antikörper binden spezifisch an vitale tumorverdächtige Zellen. Vitale Tumorzellen können damit von toten Tumorzellen getrennt werden. Die Anzahl der vitalen Tumorzellen kann in bezug auf das Volumen der eingesetzten Körperflüssigkeit angegeben werden. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert standardisierte Werte. Überdies kann das Trägermaterial, auf dem die untersuchte Körperflüssigkeit nach Markierung, Anreicherung und Trennung aufgetragen wird, zu Dokumentationszwecken aufbewahrt werden, so daß es für eine spätere Begutachtung und weitere Charakterisierung zur Verfügung steht. Bei den bisherigen Verfahren kann demgegenüber zumeist nur ein Meßprotokoll aufbewahrt werden.

[0010] Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung können sehr geringe Mengen an Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit nachgewiesen werden. Zu Testzwecken wurden beispielsweise zehn Tumorzellen zu 20 ml Vollblut gegeben. Diese zehn Tumorzellen konnten mit dem erfindungsgemäßen Verfahren vollständig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist mit dem vergleichbar, das mittels PCR erreicht werden kann, wobei jedoch die mit diesem Verfahren verbundenen Nachteile vermieden werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die quantitative Bestimmung vitaler epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit.

[0011] Zweckmäßigerweise wird die Körperflüssigkeit, insbesondere peripheres Blut, vor der Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen mit Antikörpern lytiert, um beispielsweise Erythrozyten abzutrennen. Die erhaltene Suspension wird anschließend zentrifugiert, der Überstand abgetrennt und verworfen. Es ist nicht erforderlich, daß alle Erythrozyten entfernt werden, da diese das Verfahren nicht beeinflussen.

[0012] In einer Variante der Erfindung werden die Tumorzellen vor der magnetischen Anreicherung sowohl mit antihumanen epithelialen Antikörpern, die an magnetische Partikel gebunden sind ("magnetic beads" oder "Microbeads"), als auch mit antihumanen epithelialen Antikörpern, die an ein Fluorochrom gebunden sind, markiert. Die magnetischen Partikel haben vorzugsweise einen Durchmesser, der kleiner als 70 nm ist. Die Tumorzellen tragen über die Antigen-Antikörper-Bindung sowohl magnetische Partikel als auch einen Fluoreszenzfarbstoff. Die Tumorzellen werden anschließend durch magnetische Zellseparation angereichert, indem sie z.B. auf eine Säule gegeben werden, die sich in einem starken, z.B. durch einen Permanentmagnet gebildeten, Magnetfeld befindet. Die Zellen der Körperflüssigkeit, an die keine magnetischen Partikel gebunden sind, werden aus der Säule herausgespült. Die markierten Zellen verbleiben wegen der Wirkung des Magnetfelds in der Säule. Nach dem Entfernen des Magnetfelds können die in der Säule verbliebenen Tumorzellen ausgespült werden.

[0013] Alternativ kann die magnetische Zellseparation erfolgen, bevor die vitalen epithelialen Tumorzellen

durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, markiert werden. Dazu ist es ausreichend, wenn die Tumorzellen mit den magnetischen Partikeln markiert werden.

5 [0014] Zweckmäßigerweise wird vor dem Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen ein FcR-Blockierungsreagenz zu der Körperflüssigkeit zugesetzt.

[0015] Als Antikörper werden vorzugsweise antihumane epitheliale Antikörper (HEA) verwendet, die von der Maus stammen. Als Fluorochrom wird vorzugsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) eingesetzt.

10 [0016] Nach der Anreicherung und Einfärbung der vitalen epithelialen Tumorzellen wird die Zellsuspension auf einen Träger aufgebracht. Dabei handelt es sich zweckmäßigerweise um einen Objektträger aus Glas, der vorzugsweise mit Poly-L-Lysin beschichtet ist.

15 [0017] Die Anzahl der Tumorzellen auf dem Träger bzw. Trägermaterial wird mittels Laser-Scanning-Cytometrie bestimmt. Zur Konturierung der auf dem Trägermaterial befindlichen Zellen wird zweckmäßigerweise das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) als Schwellwertparameter bei einer geringen Vergrößerung genutzt. Die Hintergrundfluoreszenz kann dynamisch bestimmt werden, um die maximale Fluoreszenzintensität und/oder die Gesamtfluoreszenz durch Integration über jede Zelle zu bestimmen. Das ermöglicht es, Veränderungen der Hintergrundfluoreszenz zu korrigieren, so daß die Fluoreszenz für jede Zelle unter den gleichen Bedingungen berechnet werden kann und äquivalente

20 Ergebnisse für jede Zelle erhalten werden. Die grüne Fluoreszenz der FITC-HEA-markierten Zellen wird vorzugsweise unter Verwendung eines 530/30 nm-Bandpaßfilters erfaßt.

25 [0018] Die angereicherten und FITC-markierten Zellen (FITC-positive Zellen) können außerdem mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Beispielsweise kann die DNA der Zellkerne mit einem DNA-spezifischen Farbstoff wie Propidiumiodid angefärbt werden. Die rote Fluoreszenz der so angefärbten Zellen wird ebenfalls mittels Laser-Scanning-Cytometrie unter Verwendung eines 625/28 nm-Bandpaßfilters erfaßt. Als Schwellwertparameter zur Konturierung dient das Vorwärtsstreulicht. Die gemessene rote und grüne Fluoreszenz werden miteinander verglichen und die Anzahl der positiven Ereignisse ermittelt.

30 [0019] Die Anzahl an markierten positiven Zellen ist im Vergleich zu nach dem im Stand der Technik bekannten Verfahren aufgrund der Anreicherung pro Volumen besonders hoch, so daß die Geschwindigkeit und die Genauigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens deutlich höher sind. Die Anzahl der gefundenen markierten Zellen wird dann auf das ursprünglich eingesetzte Volumen an Körperflüssigkeit zurückgerechnet. Das erlaubt es zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelte Nachweisergebnisse zu vergleichen. Es kann rasch der Erfolg z.B. einer Tumorthherapie erkannt werden.

35 [0020] Die Morphologie der erfaßten positiven Zellen kann anschließend durch hämatologische Färbeverfahren

ren wie die May-Grünwald-Färbung bestimmt werden.

[0021] Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt vorteilhafterweise die Durchführung mehrerer quantitativer Nachweise hintereinander. Die Zellen können quantitativ im Hinblick auf verschiedene Parameter untersucht werden. Dazu können die Zellen nach einer ersten quantitativen Auswertung z.B. mit einer ersten Nachweisstoff, z.B. einen Fluoreszenzfarbstoff, enthaltenden Lösung beaufschlagt werden, welcher z.B. spezifisch für Malignität ist. Die Koordinaten der Zellen sind bereits von der Durchführung des ersten quantitativen Nachweises bekannt und im Computer gespeichert. Es kann jede Zelle sofort aufgefunden und deren Reaktion gegenüber weiteren Nachweissubstanzen erfaßt und quantitativ ausgewertet werden. Als weitere Nachweisverfahren können insbesondere FISH oder TUNEL durchgeführt und quantitativ ausgewertet werden.

[0022] Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

[0023] In diesem Beispiel wird ein Verfahren zum Nachweis von epithelialen Tumorzellen in Blut beschrieben, bei dem die magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen nach der Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, an die ein Fluorochrom gebunden ist, erfolgt.

#### a. Herstellen einer Verdünnungsreihe von Tumorzellen enthaltendem Vollblut

[0024] Peripheres Blut wurde mit verschiedenen Anteilen an Tumorzellen gemischt. Die Tumorzellen stammten aus einer Brustkrebszelllinie (SK Br2-artig). Die Leukozyten des peripheren Blutes und die Tumorzellen wurden gezählt. In einem ersten Verdünnungsschritt wurden  $6 \times 10^5$  Tumorzellen mit 100 µl Vollblut, das  $6 \times 10^5$  Leukozyten enthielt, gemischt. Im nächsten Verdünnungsschritt wurden jeweils  $6 \times 10^4$  Tumorzellen und  $6 \times 10^3$  Tumorzellen zu 100 µl Blut gegeben. Im anschließenden Verdünnungsschritt wurden  $6 \times 10^3$  und  $6 \times 10^2$  Tumorzellen zu 1 ml Blut sowie  $6 \times 10^2$  und 60 Tumorzellen zu 10 ml oder 20 ml Blut gegeben, wobei im letzten Fall eine Verdünnung von 5 Tumorzellen auf  $10^7$  normale Zellen erhalten wurde.

#### b. Magnetische Anreicherung und Anfärbung

[0025] Zur Trennung an einer magnetischen Säule wurden 400 µl mit bis zu  $5 \times 10^7$  Zellen aus der in lit. a. erhaltenen Verdünnungsreihe mit 100 µl Blockierungsreagens 30 min in der Kälte inkubiert. Die Zellen wurden dann mit magnetischen Partikeln, an die antihumane epitheliale Antikörper gebunden sind, (100 µl HEA-Microbeads, Milteny) behandelt, 15 min inkubiert und 10mal mit dem Markierungspuffer gewaschen. Die

Säulen, an denen ein Magnet angebracht ist, wurden gewaschen und die magnetischen Partikel in den Säulen gesammelt. Die negativen Zellen wurden dann durch Spülen mit 5mal 500 µl Puffer eluiert und die Säulen vom Magnet getrennt. Die in den Säulen verbliebenen Zellen wurden mit zusätzlichem Puffer herausgespült und mit 50 µl FITC-konjugierten antihumanen epithelialen Mäuseantikörpern (HEA-FITC-Antikörper, Milteny) angefärbt.

#### c. Immobilisierung der Zellen und Bestimmung der Anzahl der Zellen

[0026] Die Zellen wurden auf Objektträger aufgetragen. Nach dem Auftragen von 100 µl der Zellsuspension haften die vitalen Zellen nach 10 bis 15 min auf der Oberfläche des Objektträgers. Für optimale Messungen muß eine Einzelzellsuspension auf dem Objektträger aufgetragen werden, wobei die Zellen einen Abstand untereinander aufweisen, der etwa dem 2- bis 3fachen des Durchmessers einer Zelle entspricht.

[0027] Die anhaftenden Zellen wurden unter Verwendung eines Laser-Scanning-Cytometers (LSC Compucyte Corp.) gemessen. Die Konturierung der auf dem Objektträger haftenden Zellen wurde unter Verwendung des Vorwärtstreulichtes (forward scatter) als Schwellwertparameter bei einer zwanzigfachen Vergrößerung durchgeführt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde dynamisch bestimmt, um sowohl die maximale Fluoreszenzintensität als auch die Gesamtfluoreszenz auf Basis einer Zelle zu berechnen. Dies ermöglicht es, die Schwankungen der Hintergrundfluoreszenz zu korrigieren, so daß die Berechnung der Fluoreszenz für alle Zellen gleichwertig erfolgt. Die grüne Fluoreszenz der positiven HEA-FITC-Zellen wurde mit einem 530/30 nm-Bandpaßfilter erfaßt und mit einem Photomultiplier verstärkt.

[0028] Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern zentrifugiert und in eine 1 mg/ml Propidiumiodid enthaltende PBS-Lösung getaucht. Der Schwellwert für die Konturierung der Zellen basierte ebenfalls auf dem Vorwärtstreulicht. Die rote Fluoreszenz wurde mit einem 625/30 nm Bandpaßfilter erfaßt und mit einem zweiten Photomultiplier verstärkt. Die rote und grüne Fluoreszenz wurden mittels eines Computerprogrammes (WinCyte, Compucyte Corporation) angeglichen und als Streulichtdiagramme, Histogramme, Prozentwerte und Mittelwerte der FITC-positiven und FITC-negativen Zellen dargestellt, wobei die Berechnung nur auf dem Bereich beruht, der Einzelzellen umfaßt.

#### d. Ergebnis

[0029] Die Korrelation zwischen der berechneten Anzahl von Tumorzellen in einer Probe der Verdünnungsreihe und der mittels dem Verfahren ermittelten Anzahl war sehr hoch ( $> 0,99$ ). Sogar bei der  $10^{-8}$ -fachen Ver-

dünnung konnten 50 von 60 Zellen nachgewiesen werden.

## Beispiel 2

**[0030]** In diesem Beispiel wird ein Verfahren zum Nachweis von epithelialen Tumorzellen in Blut beschrieben, wobei die magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen vor der Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, erfolgt.

### a. Markierung der Tumorzellen

**[0031]** 20 ml peripheres Blut wurde mit 40 ml Erylsispuffer (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) versetzt und in der Kälte 7 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in PBS-EDTA-Lösung (50 ml PBS mit 200  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA) aufgenommen, so daß das Gesamtvolumen 900  $\mu\text{l}$  betrug. Zu 300  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches wurden 100  $\mu\text{l}$  FcR-Blockierungsreagenz (Milteny), 100  $\mu\text{l}$  der magnetischen Partikel, an die antihumane epitheliale Antikörper gebunden sind, (100  $\mu\text{l}$  HEA-Microbeads, Milteny) zugegeben und gemischt. Anschließend wurden zu dieser Suspension 50  $\mu\text{l}$  FITC-konjugierte antihumane epitheliale Mäuseantikörper (HEA-FITC-Antikörper, Milteny) zugegeben und 15 min in der Kälte inkubiert.

### b. Magnetische Anreicherung

**[0032]** Die Separationssäulen wurden in den Magneten (ctaMACS, Milteny) gestellt und zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA-Lösung gewaschen. Die in a. erhaltene Suspension wurde mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA-Lösung aufgeschwemmt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA-Lösung gewaschen und aus dem Magneten entnommen. Die Säule wurde anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA-Lösung gespült, um die markierten Zellen aufzunehmen.

### c. Immobilisierung der Zellen und Bestimmung der Anzahl der Zellen

**[0033]** Auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Labor Schubert) wurden 100  $\mu\text{l}$  der bei lit. b. erhaltenen Lösung aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Anzahl der Tumorzellen wurde wie in Beispiel 1, lit. c bestimmt und die Anzahl in bezug auf das eingesetzte Volumen an peripherem Blut berechnet.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler epithelialer Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit mit

folgenden Schritten:

a) Bereitstellen einer bestimmten Menge einer Körperflüssigkeit,

b) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an magnetische Partikel gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,

c) Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit,

d) Magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen,

e) Immobilisieren der so erhaltenen Suspension auf einem Trägermaterial durch selbständiges Anhaften der vitalen Tumorzellen,

f) Erfassen der vitalen epithelialen Tumorzellen mittels Laser-Scanning-Cytometrie und Berechnen der Anzahl dieser Zellen in bezug auf die Menge der bereitgestellten Körperflüssigkeit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mittels Laser-Scanning-Cytometrie die maximale Fluoreszenzintensität und/oder die Gesamtfluoreszenz pro Zelle bestimmt wird.

3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Hintergrundfluoreszenz dynamisch bestimmt wird, so daß für jede Zelle äquivalente Fluoreszenzwerte erhalten werden.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen vor der Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit erfolgt.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die magnetische Anreicherung der vitalen epithelialen Tumorzellen nach der Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen durch Zugabe antihumaner epithelialer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind, zu der Körperflüssigkeit erfolgt.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Körperflüssigkeit vor dem Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen mit Antikörpern lysiert, zentrifugiert und der Überstand abgetrennt

und verworfen wird.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei zu der Körperflüssigkeit vor dem Markieren der vitalen epithelialen Tumorzellen ein Blockierungsreagenz zugesetzt wird. 5
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei zur Markierung der vitalen epithelialen Tumorzellen mit antihumanen epithelialen Antikörpern von der Maus stammende antihumane epitheliale Antikörper verwendet werden. 10
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei als Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) eingesetzt wird. 15
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Körperflüssigkeit aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: Blut, Knochenmark, Knochenmark-Aspirat, Transsudat, Exsudat, Lymphe, Apheresat, Aszites, Urin, Speichel und Drainageflüssigkeiten aus Wundsekreten. 20

25

30

35

40

45

50

55